



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ  
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY  
MATERIALS RESEARCH CENTRE

## VLIV VLASTNOSTÍ ČÁSTIC NA MIKROREOLOGICKÉ MĚŘENÍ BIOPOLYMERNÍCH ROZTOKŮ

INFLUENCE OF PARTICLE PROPERTIES ON MICRORHEOLOGICAL MEASUREMENTS  
OF BIOPOLYMER SOLUTIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

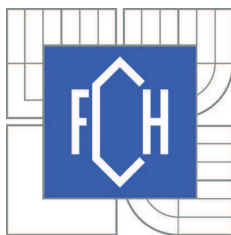
AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

LUCIE HRADECKÁ

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. ZUZANA HNYLUCHOVÁ

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK0789/2013</b>	Akademický rok: <b>2013/2014</b>
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	<b>Lucie Hradecká</b>	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Zuzana Hnylučová</b>	
Konzultanti:	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	

### Název bakalářské práce:

Vliv vlastností částic na mikreologické měření biopolymerních roztoků

### Zadání bakalářské práce:

- 1) Literární rešerše na téma využití mikreologie pro studium biopolymerních roztoků se zaměřením na vlastnosti použitých částic
- 2) Seznámit se s mikreologickým a reologickým studiem materiálů
- 3) Studium vlivu velikostí částic na výsledky mikreologických měření biopolymerních roztoků, návrh experimentů
- 4) Diskuze výsledků

### Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Lucie Hradecká  
Student(ka)

-----  
Ing. Zuzana Hnylučová  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce je zaměřena na zhodnocení vlivu částic na mikrореologické měření biopolymerních roztoků. Použitým biopolymerem byla kyselina hyaluronová a jako modelové systémy byly zvoleny roztoky glycerolu o různých koncentracích. Pro mikrореologické měření byly použity polystyrenové částice o různých průměrech (0,5  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  a 2  $\mu\text{m}$ ). Výsledky pasivní mikrореologie byly porovnány s výsledky klasické reologie a v případě glycerolu i s tabelovanými hodnotami.

## **ABSTRACT**

This bachelor's thesis is focused on the evaluation of particle influence on microrheological measurements of biopolymer solutions. Hyaluronic acid was the biopolymer and glycerol solutions of different concentration were chosen as model system. Polystyrene particles of different diameters (0,5  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  a 2  $\mu\text{m}$ ) were used for the measurements. Results of passive microrheology were compared with classic rheology and with tabulated values in case of glycerol.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

mikrореologie, reologie, kyselina hyaluronová, viskozita

## **KEYWORDS**

microrheology, reology, hyaluronic acid, viscosity

HRADECKÁ, L. *Vliv vlastností částic na mikrereologické měření biopolymerních roztoků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 34 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Zuzana Hnylučová.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT .

.....  
podpis studenta

*Poděkování:*

*Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce Ing. Zuzaně Hnylučové za odborný dohled, velmi obětavou a ochotnou spolupráci a odborné rady.*

# Obsah

## Úvod

<b>1. Teoretická část</b> .....	7
1.1 Kyselina hyaluronová.....	7
1.1.1 Struktura.....	7
1.1.2 Vlastnosti a funkce.....	7
1.2 Reologie.....	8
1.2.1 Newtonské kapaliny.....	9
1.2.2 Nenewtonské kapaliny.....	9
1.3 Viskoelastické vlastnosti.....	10
1.3.1 Viskozita.....	10
1.3.2 Elasticita.....	11
1.4 Brownův tepelný pohyb.....	11
1.5 Mikroreologie.....	12
1.5.1 Pasivní mikroreologie.....	12
<b>2. Současný stav řešené problematiky</b> .....	15
<b>3. Materiály a metody</b> .....	19
3.1 Materiály.....	19
3.2 Vybavení.....	19
3.3 Příprava vzorků.....	20
<b>4. Měření a vyhodnocení dat</b> .....	21
4.1 Měření pomocí mikroreologie.....	21
4.1.1 Příprava vzorků a záznam videa.....	21
4.1.2 Vyhodnocení.....	22
4.2 Měření klasickou reologií.....	22
<b>5. Výsledky a diskuze</b> .....	23
5.1 Glycerolová řada.....	23
5.2 Řada hyaluronanu.....	26
<b>6. Závěr</b> .....	30
<b>7. Seznam použitých zdrojů</b> .....	32
<b>8. Seznam použitých zkratk a symbolů</b> .....	34

## Úvod

Znalost viskoelastických vlastností je důležitá pro řadu odvětví. Donedávna se ke zjišťování těchto vlastností používala pouze klasická reologie, dnes už je to možné i pomocí mikroreologie. Tento pojem zahrnuje soubor technik, které se vyvinuly v posledních letech a které lze rozdělit na aktivní a pasivní metody. Aktivní mikroreologické techniky jsou náročnější kvůli manipulaci s vloženými sondami vnějšími silami, naopak pasivní mikroreologie je založena na sledování Brownova pohybu vložených částic. Výhodou oproti měření na klasickém reometru je minimální množství vzorku potřebné k mikroreologickým experimentům. To může být užitečné především v oblasti buněčných systémů nebo nehomogenních materiálů. Metoda je také využívána při zkoumání vlastností polymerů, mezifázových rozhraní nebo procesu gelace.

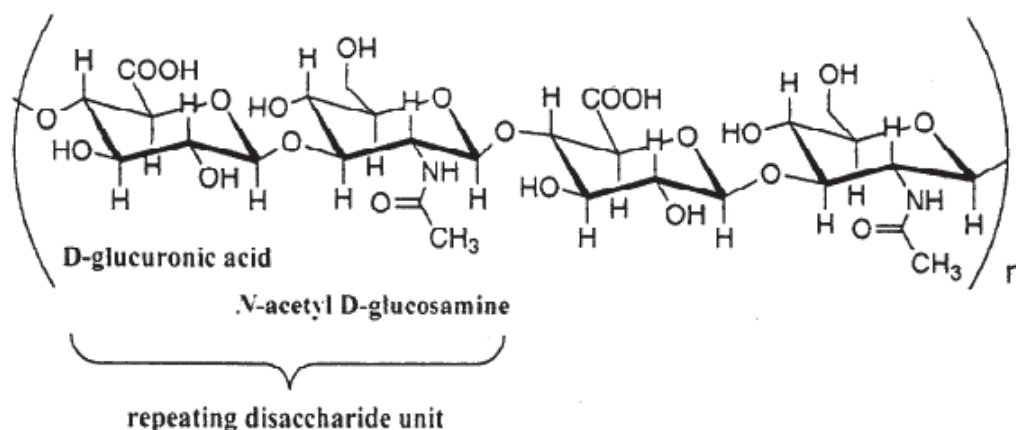
# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je látka vyskytující se přirozeně v lidském těle nejčastěji ve formě sodné soli. Díky svým unikátním vlastnostem, biokompatibilitě a biodegradabilitě, se hojně využívá v oblasti výzkumu, například v medicíně pro cílenou distribuci léčiv, nebo v kosmetickém průmyslu v přípravcích proti stárnutí pleti. V lidském těle tvoří součást pojivových, epitelových a nervových tkání, vyskytuje se v synoviální tekutině, očním sklivci, kůži i v pupěční šňůře [1].

### 1.1.1 Struktura

Kyselina hyaluronová patří mezi glykosaminoglykany, jejichž struktura je založena na bázi glukózy. Lineární polymerní molekula kyseliny hyaluronové je složena z opakujících se disacharidových jednotek, které tvoří kyselina D-glukuronová a N-acetyl-D-glukosamin. Tyto jsou střídavě propojeny  $\beta$ -1,4 a  $\beta$ -1,3 glykosidickými vazbami a jejich počet může být i 10 000 [2].



Obrázek 1: Strukturní jednotka kyseliny hyaluronové [2]

V primární struktuře kyseliny hyaluronové se nevyskytují kovalentně vázané peptidy, čímž se liší od ostatních glykosaminoglykanů. I když je kyselina hyaluronová tvořena jedním polysacharidovým řetězcem, její molekulová hmotnost běžně dosahuje hodnot v řádech milionů Daltonů.

Na první pohled by se mohlo zdát, že jednotnost struktury této látky bude omezovat její biologické role. To je ale kompenzováno množstvím specifických vazebných míst, které se nachází v jiných molekulách matrix a na povrchu buněk [1].

### 1.1.2 Vlastnosti a funkce

Karboxylové skupiny kyseliny hyaluronové jsou při hodnotě extracelulárního pH plně ionizovány. Její osmotická aktivita není ideální a je neúměrně vysoká vzhledem k molekulové

hmotnosti, což je mimo jiné důvodem její schopnosti zásadních účinků na distribuci a pohyb vody, a proto má zásadní roli pro homeostázu vody [1].

Kyselina hyaluronová je silně hydrofilní látka, která tvoří velmi viskózní roztoky. Právě pro své jedinečné reologické vlastnosti je v současné době klinicky využívána. Viskózní roztoky vysokomolekulární kyseliny hyaluronové se uplatňují při léčbě artropatií v podobě intraartikulárních injekcí, při hojení ran v různých tkáních a také v oční a ušní chirurgii.

V současné době je také snahou produkovat deriváty kyseliny hyaluronové s unikátními vlastnostmi pro konkrétní biomedicínské aplikace, například materiály, které by po implantaci nahradily kyselinu hyaluronovou terapeutickými činidly se zpožděným uvolňováním nebo s protražovaným účinkem [2].

## 1.2 Reologie

Reologie má původ ve dvou řeckých slovech, „rheo“ znamená téci a „logos“ studovat. Zabývá se tedy studiem deformace a toku materiálu v závislosti na vloženém napětí. Jedním z cílů je najít vztahy mezi napětím, deformací a rychlostí deformace pro jednotlivé druhy látek [3].

Jednoduché tuhé látky ukládají energii a poskytují pružnou elastickou odezvu, zatímco jednoduché kapaliny odvádí energii viskózním tokem. U více komplexních viskoelastických materiálů se projevuje chování jak pevných látek, tak tekutin, a výsledek závisí na míře deformace vzorku [4].

Reologické chování tekutých materiálů má důležitou roli v řadě technologických procesů. Znalost reologických veličin, viskozity, meze toku a modulů pružnosti je potřebná k charakterizaci surovin či produktů, ale i k řešení technických úloh a inženýrských výpočtů. Matematickým vyjádřením tokových vlastností kapalin jsou reologické stavové rovnice vyjadřující vztah mezi deformačním smykovým (tečným, vazkým) napětím a deformací kapaliny. Grafickou podobou těchto závislostí jsou tokové křivky [3].

Jedním ze způsobů vyjádření reologické odezvy materiálu je aplikování budícího signálu a sledování účinku deformace. V klasické reologii se takové měření provádí s několika mililitry vzorku na mechanickém reometru [4].

Látky z reologického hlediska nikdy nejsou zcela viskózní nebo zcela elastické, ale do určité míry se chovají jako kapalné a tuhé zároveň. Materiálové vlastnosti kapalin charakterizuje viskozitní modul, pevných látek elastický modul:

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad (1)$$

kde reálnou část komplexního smykového modulu  $G^*$  tvoří elastický modul  $G'$ , který vyjadřuje míru deformační energie uloženou v materiálu během napětíového cyklu. Viskozitní



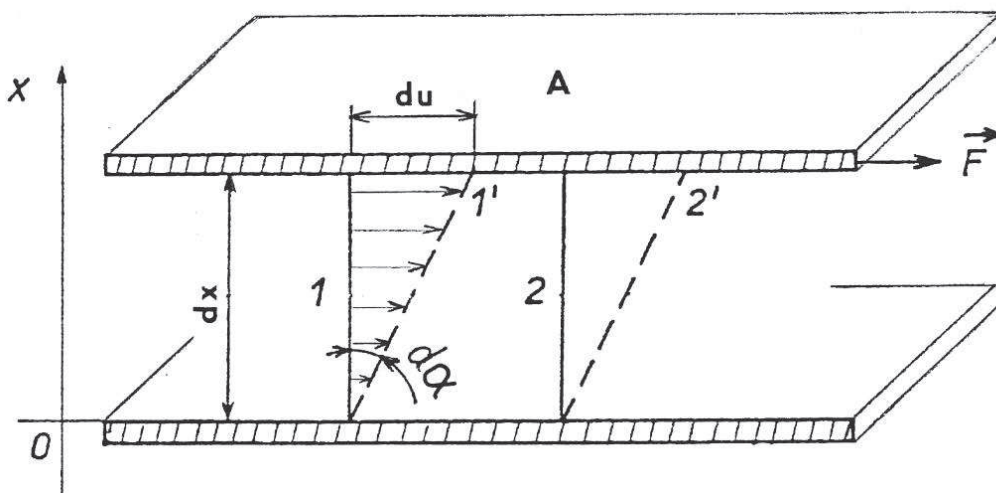
modul  $G''$  udává ztrátu energie během napěťového cyklu a tvoří imaginární složku komplexního smykového modulu [5].

### 1.2.1 Newtonské kapaliny

Pro tečné napětí ideálně viskózních kapalin platí Newtonův zákon:

$$\tau = \eta \frac{du}{dx} = \eta \cdot D \quad (2)$$

kde  $du$  je vzájemná rychlost pohybu smykových rovin vzdálených o  $dx$ ,  $D$  je takzvaný gradient rychlosti, který charakterizuje tvarové změny v proudící tekutině. Součinitel  $\eta$  udává dynamickou viskozitu, která charakterizuje vnitřní tření newtonské kapaliny [6].



Obrázek 2: Rychlostní profil toku v kapalině mezi nepohyblivou a pohybující se deskou [7]

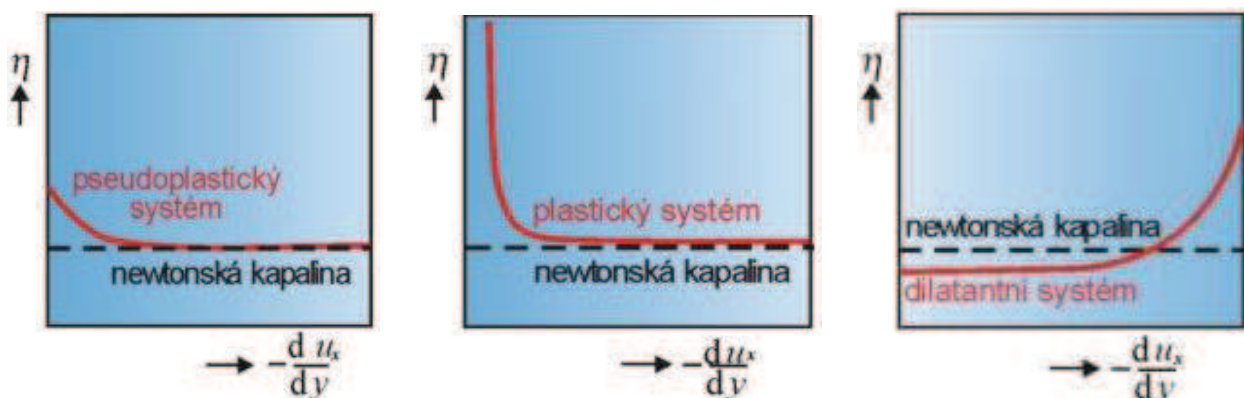
### 1.2.2 Nenewtonské kapaliny

Tyto kapaliny jsou reologicky složitější a neřídí se Newtonovým zákonem. Platí pro ně analogicky s Newtonovým zákonem rovnice:

$$\tau = \eta \cdot D \quad (3)$$

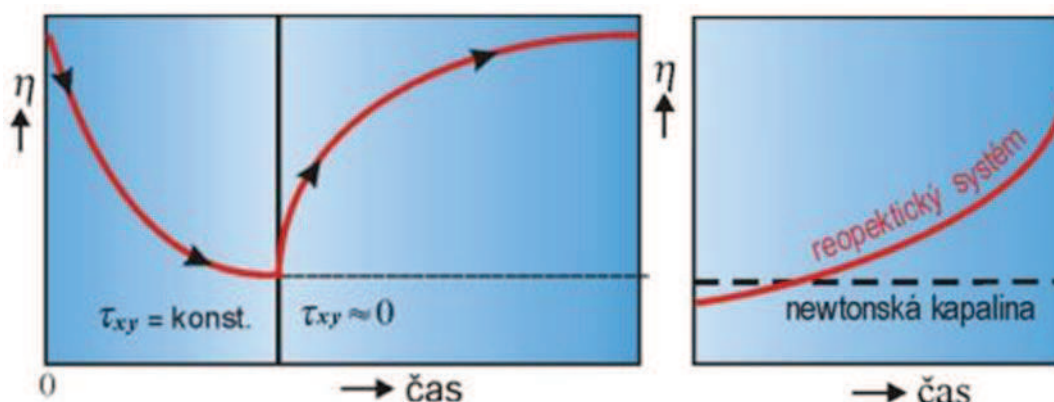
kde  $\eta$  značí zdánlivou viskozitu, která není látkovou konstantou, ale v každém bodě závisí na rychlosti deformace nebo na tečném napětí. Podle průběhu těchto závislostí se rozlišují různé typy nenewtonských kapalin.

U pseudoplastických a plastických kapalin zdánlivá viskozita s rostoucím gradientem rychlosti klesá. U dilatantních kapalin je tomu naopak.



Obrázek 3: Průběh viskozity pseudoplastické, plastické, dilatantní a newtonské kapaliny [8]

Viskozita nenewtonských kapalin může být časově závislá. Zdánlivá viskozita pseudoplastických a plastických látek je zpočátku vysoká a časem s mechanickým namáháním postupně klesá, takové kapaliny jsou označovány jako tixotropní. Kapaliny, u nichž zpočátku malá hodnota zdánlivé viskozity roste s dobou působení smykového napětí, se nazývají reopektické. Pokud se tixotropní a reopektický systém ponechá v klidu, vrátí se zdánlivá viskozita na původní hodnotu [6].



Obrázek 4: Časová závislost zdánlivé viskozity tixotropní kapaliny a porovnání viskozity reopektické a newtonské kapaliny [8]

## 1.3 Viskoelastické vlastnosti

### 1.3.1 Viskozita

Viskozita je fyzikální vlastnost kapalin, která charakterizuje vnitřní tření v materiálech. Udává poměr mezi tečným napětím a změnou rychlosti v závislosti na vzdálenosti sousedních vrstev při proudění kapaliny. Viskozita charakterizuje vnitřní tření a závisí hlavně na přitažlivých silách mezi částicemi. Ideální kapaliny mají hodnotu viskozity nulovou [5].

Dynamická viskozita je látkovou charakteristikou a její hodnota závisí na teplotě a tlaku. U plynů s teplotou roste, u kapalin naopak klesá. Kinematická viskozita je definována jako podíl dynamické viskozity a hustoty [3].

### 1.3.2 Elasticita

Elasticita materiálu udává míru náchylnosti pevné látky k návratu do původního stavu po deformaci způsobené vnějším tlakem. U elastického materiálu dojde k okamžité deformaci, při stálém zatížení deformace přetrvává, ale po ukončení působení vnějšího napětí se materiál vrátí do původního stavu. Elastickou deformaci lze označit jako vratnou. Čistě viskózní materiál se do původního stavu nikdy nenavrací. U viskoelastických materiálů existuje časová závislost na použitém tlaku, ta ale nemusí být lineární jako u viskózních materiálů nebo konstantní jako u elastických materiálů [9].

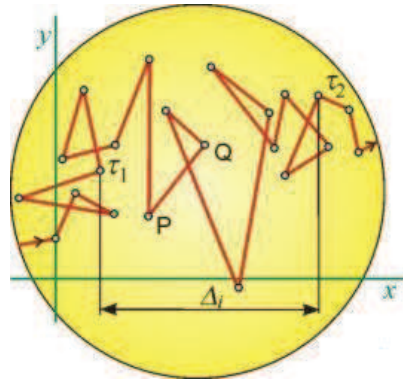
### 1.4 Brownův tepelný pohyb

Pohyb částic v mikroheterogenních a koloidních systémech, který se dá pozorovat mikroskopem a ultramikroskopem, se nazývá Brownův pohyb. Poprvé byl pozorován biologem Robertem Brownem v roce 1827 u pylových zrnků ve vodě [10].

Brownův pohyb popisuje ustavičný neuspořádaný pohyb mikroskopických částic rozptýlených v kapalném nebo plynném prostředí. Částice se v důsledku srážek s velkým počtem molekul disperzního prostředí pohybuje různými směry po velmi složité dráze. Částice vykonávají translační i rotační pohyb. Rotační pohyb se projevuje hlavně u anizotropních částic. S rostoucí velikostí a hmotností částice se zvyšuje pravděpodobnost kompenzace nárazů, proto u částic s průměrem větším než 4  $\mu\text{m}$  není pozorován tepelný pohyb, částice pouze vibrují. V důsledku častých změn rychlosti i směru není možné určit skutečnou délku dráhy. Pozorováním pohybu částice pod mikroskopem a zaznamenáním její polohy v pravidelných časových intervalech lze získat plošnou projekci o pohybu částice. Všechny směry pohybu jsou rovnocenné, proto stačí sledovat přemísťování částic ve směru jedné zvolené osy, například osy  $x$ . Posuv částice o  $\Delta x_i$  pak označuje průmět skutečného přemístění do osy  $x$  za časový interval  $\tau_2 - \tau_1$ . Střední posuv udává průměr z posuvů jedné částice v  $n$  stejných, za sebou jdoucích intervalech. Představuje statistickou charakteristiku intenzity tepelného pohybu.

$$\overline{\Delta x} = \sqrt{\frac{\Delta x_1^2 + \Delta x_2^2 + \Delta x_3^2 + \dots}{n}} \quad (4)$$

V makroskopickém měřítku se tepelný pohyb projevuje jako difuze. Při současném působení gravitačního nebo odstředivého pole vede k ustavení sedimentační rovnováhy, také je příčinou různých membránových jevů (osmóza, Donnanovy rovnováhy) [6].



Obrázek 5: Dráha částice a střední posuv [8]

## 1.5 Mikroreologie

Reologická měření poskytují cenné informace o strukturním uspořádání a mechanických vlastnostech řady materiálů. Klasické mechanické techniky však nejsou vhodné pro všechny systémy. Pro experimenty s klasickým reometrem jsou potřeba vzorky o objemech v řádech mililitrů. Vyvinuly se tedy nové mikroreologické techniky, které potřebují vzorky řádově v mikrolitrech, a lze je použít i pro heterogenní systémy. Principem těchto metod je lokální deformace vzorku vloženými mikročásticemi. Existují dvě skupiny mikroreologických metod. První používá aktivní manipulaci s částicemi působením magnetického pole, elektrického pole nebo jiných mikromechanických sil. Aktivní mikroreologie tedy zahrnuje metody, kdy se na vzorek působí vnějším tlakem a výsledné napětí se použije k získání smykového modulu [4].

### 1.5.1 Pasivní mikroreologie

Druhou skupinou jsou pasivní mikroreologické techniky, které k určení reologických vlastností využívají tepelnou energii částic, definovanou  $k_B T$ , a jsou založeny na sledování Brownova pohybu. Poměr mezi hustotou tepelné energie částice o poloměru  $a$  a elastickou energií potřebnou k deformaci materiálu s elastickým modulem  $G'$  popisuje rovnice:

$$\frac{k_B T}{a^3} = \frac{G' L^2}{a^2} \quad (5)$$

kde  $k_B$  je Boltzmanova konstanta, která má hodnotu  $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ,  $T$  je termodynamická teplota a  $L$  udává délku posunu.

Pro většinu materiálů by se teplota během měření nijak výrazně měnit neměla. Pasivními technikami je proto možné změřit horní mez elastického modulu, která závisí na velikosti zabudované částice a na schopnosti vyřešit odchylky částic o řád  $L$ . Rozlišení závisí na konkrétním použitém systému detekce, obvykle se pohybuje v rozmezí od 0,1 do 10 nm, což umožňuje měření s mikrometrovými částicemi s elastickým modulem po 10 až 500 Pa.

Tento rozsah je menší než u aktivní mikrореologie, ale je dostatečný ke studiu mnoha materiálů [4].

V čistě viskózním mediu vykonávají částice pouze Brownův pohyb. Dynamika pohybu se popisuje časově závislou korelační funkcí jednotlivých částic. Tato korelační funkce se značí MSD (mean squared displacement) a je definována:

$$\langle \Delta x^2(\tau) \rangle = \langle (x(t + \tau) - x(t))^2 \rangle \quad (6)$$

kde  $x$  je  $d$ -rozměrná pozice částice,  $\tau$  udává časový interval a závorky naznačují, že se jedná o průměrnou hodnotu v čase.

Difuzní koeficient  $D$  se pak dá získat z rovnice:

$$\langle \Delta x^2(\tau) \rangle = 2dD\tau \quad (7)$$

kde  $d$  označuje dimenzi.

Dosažením difuzního koeficientu do Stokes-Einsteinovy rovnice lze vypočítat viskozitu  $\eta$ :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (8)$$

Elastické materiály nevykazují žádný vzrůst MSD v čase, zatímco u viskózních materiálů je závislost MSD na čase lineární. Jsou tedy dva limitní případy, čistě elastické materiály, jejichž směrnice křivky závislosti MSD na čase je rovna nule, a čistě viskózní materiály, jejichž směrnice křivky je rovna jedné. Vlastnosti viskoelastických materiálů se časem mění [5].

Mikrореologii lze také rozdělit na jednočásticovou a dvoučásticovou. Jednočásticová mikrореologie představuje dobrou metodu pro studium reologických vlastností vzorků o velmi malých objemech a při větším rozsahu frekvencí v porovnání s klasickou reologií.

Zjišťování vlastností celého objemu vzorku závisí u jednočásticových metod na struktuře materiálu a volbě velikosti částic. S malými částicemi lze spíše zkoumat mikrostrukturu jejich okolního prostředí. Interakce povrchu částic se vzorkem jsou nežádoucí a podle povahy vzorku se částice upravují tak, aby nedocházelo k chemickým modifikacím struktury materiálu kolem částic.

Výhoda mikrореologie se může projevit u heterogenních vzorků, kde je nutno brát v úvahu jednotlivé částice, jelikož každá z nich se může nacházet v jiném mikroprostředí. Byly vyvinuty statistické techniky, aby bylo možné zjistit prostorové a časové změny mechanické

odezvy. Navíc částice s podobným lokálním prostředím mohou být seskupeny do souboru tak, aby výsledkem byly průměrné reologické a strukturní vlastnosti.

Výše zmíněná teorie pro pasivní mikrereologii patří k jednočásticové mikrereologii. Další inovativní pasivní technikou je dvoučásticová mikrereologie, která sleduje kros-korelační pohyb dvojic částic. Tento pohyb není ovlivněn velikostí ani tvarem částic a také nezávisí na specifické interakci mezi částicí a systémem. Při měření se tedy nepozoruje velikost ale vzdálenost částic, která se pohybuje v rozmezí 10 až 100 mikronů [4].

## 2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Mikroreologie je ještě stále relativně novou metodou, a proto se u experimentů provádí srovnávací měření klasickou reologickou metodou, pokud je vzorek k dispozici v dostatečném objemu. Ale právě potřeba malých objemů pro mikroreologické měření je velkou výhodou v biologických oborech, hlavně při zkoumání vlastností tekutin uvnitř buněk.

**Mason G. T. a kol.** ve svém článku prezentují mikroreologii jako novou metodu pro měření viskoelastických vlastností komplexních tekutin. Jejich snahou je dokázat, že tyto vlastnosti lze zjistit sledováním tepelného pohybu jedné částice v tekutině. Pro experiment použili roztok PEO (polyethylenoxid) a polystyrenové částice o poloměrech 0,26  $\mu\text{m}$  a 0,49  $\mu\text{m}$ . Pohyb částic sledovali detekováním rozptýleného laserového světla. Pro srovnání provedli experiment i pomocí metody difuzní vlnové spektroskopie. Poté, co prokázali srovnáním výsledků platnost metody pro PEO, provedli pokus s koncentrovaným roztokem DNA v pufru. Vzali DNA z telecího brzlíku, která se dá získat i v dostatečném množství pro klasickou reologii. Srovnáním výsledků obou metod opětovně potvrdili shodu mikroreologických i reologických dat. Správnost získaných výsledků potvrdili ještě doplňkovou metodou sledováním pohybu částice pomocí videa [11].

Jednočásticovou a dvoučásticovou mikroreologií se ve svém článku zabývali **A. J. Levine** a **T. C. Lubensky**. Použili model homogenního viskoelastického media pro ověření správnosti výsledků získaných výpočtem ze Stokes-Einsteinovy rovnice. Model byl složen z viskoelastické sítě vložené do newtonské kapaliny. Provedli modelový výpočet, který ukazoval rozsah platnosti Stokes-Einsteinovy rovnice pro typické pokusy a který navíc představoval kvantitativní předpověď pro frekvenční režimy, pro které rovnice neplatí. Dále se zabývali vlivem samotných částic, které způsobily nehomogenitu zkoumaného objemu. Pro měření použili částice velikosti 1  $\mu\text{m}$ . Použili analogii mezi elektrickými a reologickými veličinami a zjistili, že při zaměření na jednu částici výsledky charakterizují pouze její okolí. Zaměřením na dvojici částic, dostatečně vzdálených od sebe, lze získat informace o celém objemu. Kombinací jednočásticové a dvoučásticové mikroreologie je tedy možné popsat viskoelastické vlastnosti v okolí jednotlivých částic a zároveň charakterizovat reologické vlastnosti vzorku jako celku [12].

**Dasgupta Bivash R. a kol.** ve své studii prověřovali platnost mikroreologických měření roztoků polymerů. Zvolili dvě metody dynamického rozptylu světla ke sledování tepelného pohybu vložených částic a to QELS (quasielastic light scattering) a DWS (diffusing wave spectroscopy). Použili roztoky PEO (polyethylenoxid) o dvou různých molekulových hmotnostech a třech různých koncentracích. Zkoumané polystyrenové částice měly různé průměry v rozsahu od 0,46  $\mu\text{m}$  do 2,0  $\mu\text{m}$ . Částice o průměru 0,65  $\mu\text{m}$  byly modifikovány sulfátem, zbylé byly z karboxylátem modifikovaného latexu. Celková koncentrace částic v roztoku tvořila 1 hm%. Paralelně provedli experiment i klasickou reologií bez přítomnosti částic. Srovnáním výsledků potvrdily shodu reologických i mikroreologických dat, čímž prokázali, že v případě PEO nemá velikost částic ani jejich povrch prokazatelný vliv na konečné výsledky [13].



Na experimenty s nehomogenními medii se zaměřil **John R. de Bruyn**. Předmětem zájmu jeho práce byly materiály, které přecházely ze stavu viskózní kapaliny do stavu elastického gelu. Taková situace nastane, když se mikrostruktury části materiálu dostatečně propojí tak, aby vytvořily síť, která zahrne i vzorek. Přechodem do stavu gelu se rozumí perkolační přechod. Například v případě řetězce polymeru, číslo  $p$  bude udávat pravděpodobnost, kdy se řetězce zkříží a propojí. S rostoucí hodnotou  $p$  se zvětšují shluky propojených řetězců. Pro gelový přechod je charakteristická kritická konstanta  $p_c$ . Při svých experimentech použil částice o průměrech 0,1  $\mu\text{m}$ , 0,2  $\mu\text{m}$  a 0,3  $\mu\text{m}$ . Při nízkých hodnotách  $p$  se částice pohybovaly volně, ale s rostoucími hodnotami byl jejich pohyb omezován, až byly při vysokých hodnotách uvězněny. V průběhu experimentů zjistil, že zobecněná Stokes-Einsteinova rovnice neplatila při vyšších hodnotách  $p$ , kdy vznikající gel ovlivňoval pohyb částic. Použití této rovnice bylo vůbec diskutabilní, protože modely nehomogenního media nebyly kontinuální. Přesto však výsledky obsahovaly určité informace o vlastnostech daného media [14].

Viskoelastické vlastnosti hyaluronanu (HA) pomocí mikrореologie ve své studii zkoumali **N. Nijenhuis a kol.** Zaměřili se na hyaluronan nacházející se v endoteliální glykokalyx (EG) krevních cév. EG tvoří ochranou a selektivní vrstvu, která obsahuje vázané proteoglykany, glykoproteiny, glykosaminoglykany a adsorbované plazmové proteiny. Endoteliální buňky mají tři HA syntázy a molekulární hmotnost HA závisí na tom, která z nich se do syntézy zapojí. Pro experimenty použili roztoky HA o koncentracích a molekulárních hmotnostech podobných těm v EG a stanovovali přesné pozice 0,8  $\mu\text{m}$  částic oxidu křemičitého metodou laserové interferometrie. Na základě výsledků potvrdili, že HA je pružný polymer. Také zjistili, že elasticita HA sítě rychle zmizí (cca 15 minut) po přidání hyaluronidázy, zatímco viskozita je i po dvou hodinách působení tohoto enzymu stále třikrát větší než u vody [15].

S rozvojem nanotechnologií se v dnešní době řeší i otázka toxicity nanočástic. Z tohoto hlediska jsou klíčové interakce cytoplazmatických proteinů s cizími částicemi. Existuje široké spektrum možností, jaké interakce proběhnou mezi vloženými částicemi a buněčnými komponenty. Hlavním cílem **M. Ehrenberga a J. L. McGratha** bylo získat částice, které by reagovaly s cytoplazmatickými proteiny charakteristickým způsobem. Po experimentu použili pasivní mikrореologickou metodu sledování Brownova pohybu částic. Takto sledovali částice oxidu křemičitého, oxidu titaničitého a polystyrenové částice s různou povrchovou karboxylací. Zjistili, že chemický povrch částic má velký význam při interakcích s proteiny. Zároveň objevili karboxylované částice oxidu křemičitého, které byly mimořádně odolné vůči vazbě na proteiny. Když k nim však připojili aktin-vázající molekulu faloidinu, změnili jejich povrch tak, že už se také vázaly na aktin. Podařilo se jim tedy demonstrovat potenciální možnost kontroly specifity povrchu částic [16].

**Moschakis T. a kol.** ve svém článku studovali kinetiku gelování roztoku kaseinátu sodného, způsobenou acidifikací. Experiment provedli metodou klasické reologie a sledováním pohybu částic konfokálním mikroskopem. Hlavním cílem bylo porovnat výsledky obou metod a to pro kaseinát sodný v solu a gelu i v přechodném stavu sol-gel.



Mechanické vlastnosti zkoumali pomocí fluorescenčních mikročástic o průměrech 0,21; 0,32; 0,5 a 0,89  $\mu\text{m}$  a s různě chemicky modifikovanými povrchy. Polystyrenové částice o průměru 0,5  $\mu\text{m}$  byly modifikovány karboxylátem. Polystyrenové částice o průměrech 0,21 a 0,89  $\mu\text{m}$  obsahovaly karboxylovou skupinu. Částice o průměru 0,32  $\mu\text{m}$  byly z poly(2-vinylpyridinu) a jejich povrch byl upraven polyethylenglykolem. Při acidifikaci, kdy se hodnota pH přiblížila izoelektrickému bodu, se částice začaly adsorbovat na vznikající proteinovou síť. Navzdory tomu se výsledky mikrореologické metody od klasické příliš nelišily, hodnoty modulů byly jen o trochu nižší a body gelace se velmi blízce shodovaly u obou technik [17].

Dominantní strukturní složkou cytoskeletonu jsou aktinová vlákna (F-aktin). Mechanické vlastnosti sítí a shluků z aktinových vláken se intenzivně zkoumají, přesto mechanismus ještě není zcela známý. **Hyungsuk Lee a kol.** vyzkoušeli metody aktivní i pasivní mikrореologie k odhadnutí mechanických vlastností aktinových sítí velikostí podobným těm, které se nachází v buňkách. Pasivní metodou sledovali tepelný pohyb koloidních částic, z metod aktivní mikrореologie použili optické pasti k oscilaci vložených mikročástic a sledovali reakce za účelem získání viskoelastivity ve fyziologicky relevantním rozsahu sil. Pro experimenty použili částice s funkčními aminoskupinami o průměrech 0,5  $\mu\text{m}$  a 1,0  $\mu\text{m}$ . Při pozorování částic, které se průměrem blížily délce vláken, byla hodnota modulu nižší než u pozorování menších částic, velikost částic tedy do jisté míry ovlivňovala viskoelasticitu aktinových sítí, stejně tak jako délka vláken tvořících síť. Konečné výsledky metod pasivní i aktivní mikrореologie se dobře shodovaly za nízkého napětí, při vystavení vyšším hodnotám napětí se projevovalo nelineární chování [18].

Embryonální fibroblasty a fibroblasty dospělých jedinců mohou být znovu pluripotentní přeprogramováním genů a jejich expresí. Existují důkazy, které naznačují, že tyto lidské indukované pluripotentní kmenové buňky (HIPS – human induced pluripotent stem cells) a lidské embryonální kmenové buňky (HES – human embryonic stem cells) jsou podobné chováním, karyotypem i morfologicky. **Brian R. Daniels a kol.** se ve své studii snažili zjistit, zda jsou i fyzikální vlastnosti zmíněných buněk stejné. Za tímto účelem použili metodu pasivní mikrореologie sledování částic, aby mohli porovnat viskoelastické vlastnosti cytoplazmy HIPS, HES a nevyčísleně diferencované rodičovské fibroblasty, ze kterých získali HIPS buňky. Pro experimenty zvolili fluorescenčně značené polystyrenové částice o průměru 1,0  $\mu\text{m}$ . Z výsledků zjistili, že rodičovské fibroblasty vykazovaly viskozitu i elasticitu, ale HIPS buňky byly čistě viskózní. U HES buněk byla cytoplazma převážně viskosní, ale obsahovala subcelulární oblasti s elastickým chováním. Výsledky experimentů podpořily hypotézu, že intracelulární elasticita koreluje se stupněm buněčné diferenciaci, a odhalily významné rozdíly v mechanických vlastnostech HIPS a HES buněk. Mechanické podněty určují konečný stav diferenciaci kmenových buněk, výsledky experimentů proto podporují představu, že „měkkost“ kmenových buněk je klíčovým faktorem u jejich diferenciaci zprostředkované silou. Dále naznačují, že mohou existovat jemné funkční rozdíly mezi HIPS buňkami, u nichž byla diference vyvolána silou, a HES buňkami [19].

Mikroreologii využili i **R. P. Slopek a kol.** ke sledování mechanických vlastností roztoků v průběhu fotopolymerizace. Pro experiment použili akrylátové monomery, fotoiniciátor 2,2-dimethoxy-1,2-difenylethan-1-on (DMPA) a fluorescenčně značené polystyrenové částice o průměru 0,5  $\mu\text{m}$ . Polymerizaci iniciovali vystavením vzorků UV záření. V počáteční fázi polymerizace nepozorovali výrazné změny viskozity, až při přechodu do stavu gelu došlo k výrazné změně, kterou snadno zachytili sledováním pohybu částic. Proces gelovatění sledovali také jako funkci hloubky pronikání UV záření do vzorku. Došli k závěru, že mikroreologie je cenným nástrojem při studiu kinetiky radikálové polymerizace [20].

### 3. MATERIÁLY A METODY

#### 3.1 Materiály

Hyaluronan	Sodium hyaluronate $M_w = 300 - 500$ kDa, Contipro Biotech s. r. o., číslo šarže 213 – 6349
Glycerol	$C_3H_8O_3$ , čistota $\geq 99,0$ %, Onex chemie s. r. o., číslo šarže 04099
Částice	Polystyrenové částice, velikost $0,5 \mu m$ , Sigma – Aldrich, číslo šarže 95585 – 5ML – F Polystyrenové částice, velikost $1 \mu m$ , Sigma – Aldrich, číslo šarže 72938 – 10ML – F Polystyrenové částice, velikost $2 \mu m$ , Sigma – Aldrich, číslo šarže 78452 – 5ML – F
Rozpouštědlo	Mili-Q voda (Milipore Academic)

#### 3.2 Vybavení

Nicon eclipse Ci	optický mikroskop, zvětšovací možnosti 20x až 100x
CCD kamera (CMOS USB 3.0)	kamera připojená k mikroskopu, se softwarem uEye Cockpit, rozlišení $1280 \times 1024$ , maximální rychlost snímání 60 snímků/s
Reometr AR G2	se systémem souosých válců
Programy	ImageJ umožňuje převádět videa do různých formátů  IDL software pro vyhodnocení pohybu částic  Cell Sens Entry program pro úpravu videí

### 3.3 Příprava vzorků

Byly připraveny roztoky glycerolu, kdy hmotnostní procenta ve vodě se pohybovala v rozmezí od 10% do 80%. Pro měření metodou klasické reologie bylo připraveno 10 ml každého roztoku. Při mikroreologickém měření bylo potřeba 0,5 ml každého vzorku pro 0,5  $\mu\text{m}$  částice, 1 ml pro 1  $\mu\text{m}$  částice a 2 ml pro 2  $\mu\text{m}$  částice. K mikroreologickým vzorkům bylo před měřením přidáno 10  $\mu\text{l}$  roztoku polystyrenových částic a všechny vzorky byly promíchány na vortexu.

Byl připraven zásobní roztok hyaluronanu ve vodě o hmotnostní koncentraci 1 %, který byl ponechán jeden den na magnetické míchačce při laboratorní teplotě. Byl použit hyaluronan s molekulovou hmotností 300-500 kDa. Ze zásobního roztoku byly ředěním připraveny další roztoky a výsledkem byla koncentrační řada v rozsahu 0,01 % až 1 %. Pro klasickou reologii bylo připraveno 10 ml a pro mikroreologickou metodu bylo potřeba 0,5 ml vzorku pro 0,5  $\mu\text{m}$  částice, 1 ml pro 1  $\mu\text{m}$  částice a 2 ml pro 2  $\mu\text{m}$  částice. Ke každému vzorku bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  roztoku polystyrenových částic a vzorky byly promíchány na vortexu.

Byly připraveny kontrolní vzorky s Mili-Q vodou, pro zjištění odchylky měření. Pro 0,5  $\mu\text{m}$  částice bylo potřeba 0,5 ml vody, pro 1  $\mu\text{m}$  částice 1 ml a pro 2  $\mu\text{m}$  částice 2 ml. Ke každému vzorku bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  roztoku polystyrenových částic a vzorky byly promíchány na vortexu.

Celkem byly připraveny a proměřeny čtyři glycerolové řady, čtyři řady s hyaluronem a tři kontrolní řady s Mili-Q vodou. Pro první řadu byly použity 0,5  $\mu\text{m}$  částice, pro druhou 1  $\mu\text{m}$  částice a pro třetí 2  $\mu\text{m}$ . Každé měření s těmito řadami bylo provedeno třikrát. Čtvrtá řada byla proměřena metodou klasické reologie. Vzorky s Mili-Q vodou byly proměřeny pouze mikroreologickou metodou.

## 4. MĚŘENÍ A VYHODNOCENÍ DAT

### 4.1 Měření pomocí mikroreologie

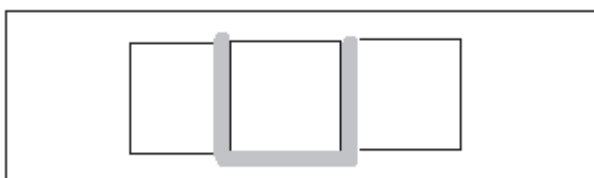
Mikroreologické měření probíhalo na optickém mikroskopu Nikon Eclipse Ci. Metoda Multiple particle tracking (MPT) je založena na pozorování mikrometrových částic pomocí videomikroskopie. Částice se pohybují v závislosti na Brownově pohybu, tento pohyb byl zaznamenán na videa, která byla zpracována v softwarech ImageJ a IDL.

#### 4.1.1 Příprava vzorků a záznam videa

K mikroskopu Nikon Eclipse Ci byla připojena CCD kamera, díky které byla pořízena videa k vyhodnocení viskozity.



Z laboratorních sklíček byla z jednoho podložního a tří krycích vytvořena přihrádka (viz obrázek 7), do které bylo napipetováno přibližně 30  $\mu\text{l}$  vzorku. Sklíčko bylo umístěno pod mikroskop. Zvětšení bylo nastaveno 20x, 40x nebo 60x v závislosti na velikosti částic. Pak byl spuštěn program pro nahrání videa. Hodnota rychlosti nahrávání videí byla 30,04 snímků/s a každé video tvořilo přibližně 300 snímků.



Obrázek 7: Návrh přihrádky z laboratorních sklíček pro mikroreologické experimenty

### 4.1.2 Vyhodnocení

Natočená videa byla ve formátu AVI, ale pro zpracování v softwaru IDL je bylo potřeba převést na formát TIF. Každé video bylo tedy převedeno na formát TIF pomocí programu ImageJ. Dále bylo upraveno v programu Cell Sens Entry tak, aby bylo docíleno lepšího kontrastu částic a okolí pro následné zpracování.

Takto upravená videa byla použita k vyhodnocení v softwaru IDL, který analyzuje pohyb částic. Nejprve je na jednom snímku umožněn výběr studovaných částic, který je pak aplikován na všechny snímky daného videa, a následně jsou vyhodnoceny trajektorie částic. Výsledkem byla hodnota MSD, ze které byla vypočítána hodnota difuzního koeficientu  $D$  a následně viskozita. Hodnoty viskozit byly vyneseny do grafu a porovnány s tabelovanými hodnotami, pokud to bylo možné.

## 4.2 Měření klasickou reologií

Měření viskozity bylo také provedeno klasickou reologií na reometru AR G2 od firmy TA Instruments. Před samotným měřením bylo nejdříve nastaveno pětiminutové ustálení vzorku a teploty na 21 °C. Pro měření byla použita soustava válec-válec a metoda ustáleného stavu (Steady state), kdy se měří tokové vlastnosti. Maximální doba měření jednoho bodu viskózní křivky byla omezena na 3 minuty. K dalšímu vyhodnocování byly brány pouze body, které dosáhly rovnováhy před uplynutím stanoveného časového limitu. Teplota během celého měření byla nastavena na 21 °C, jelikož mikroreologická měření také probíhala při této teplotě.

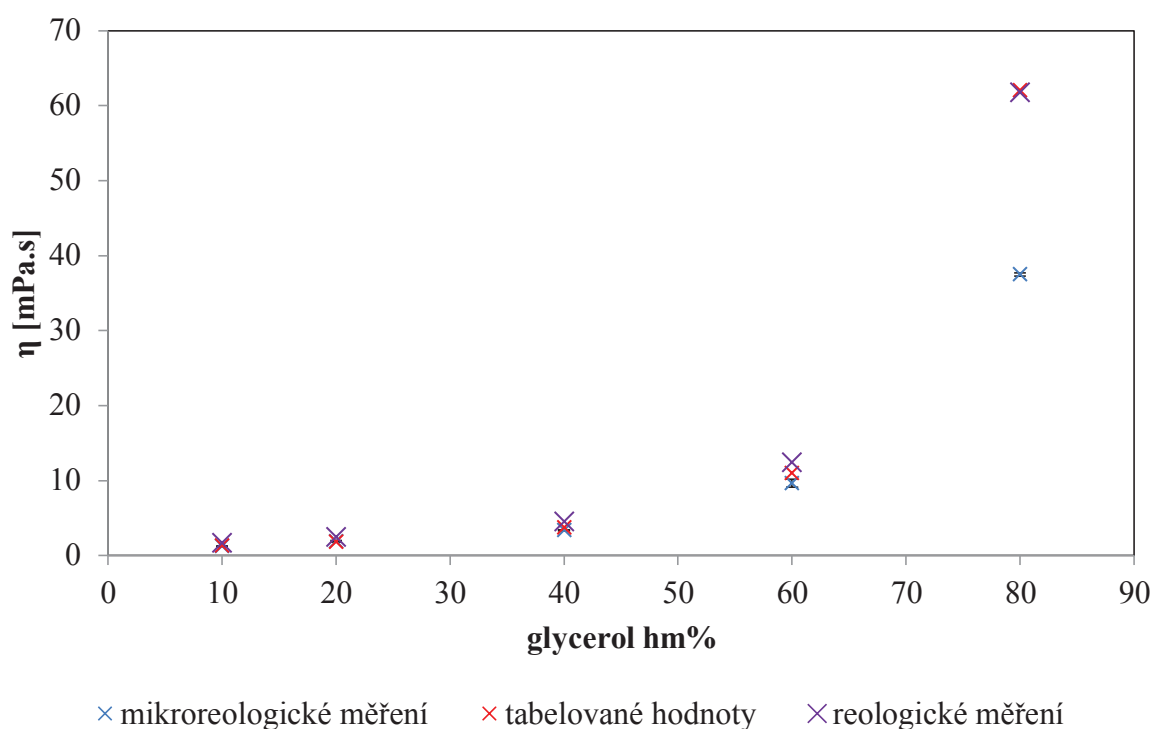


Obrázek 8: Reometr AR G2

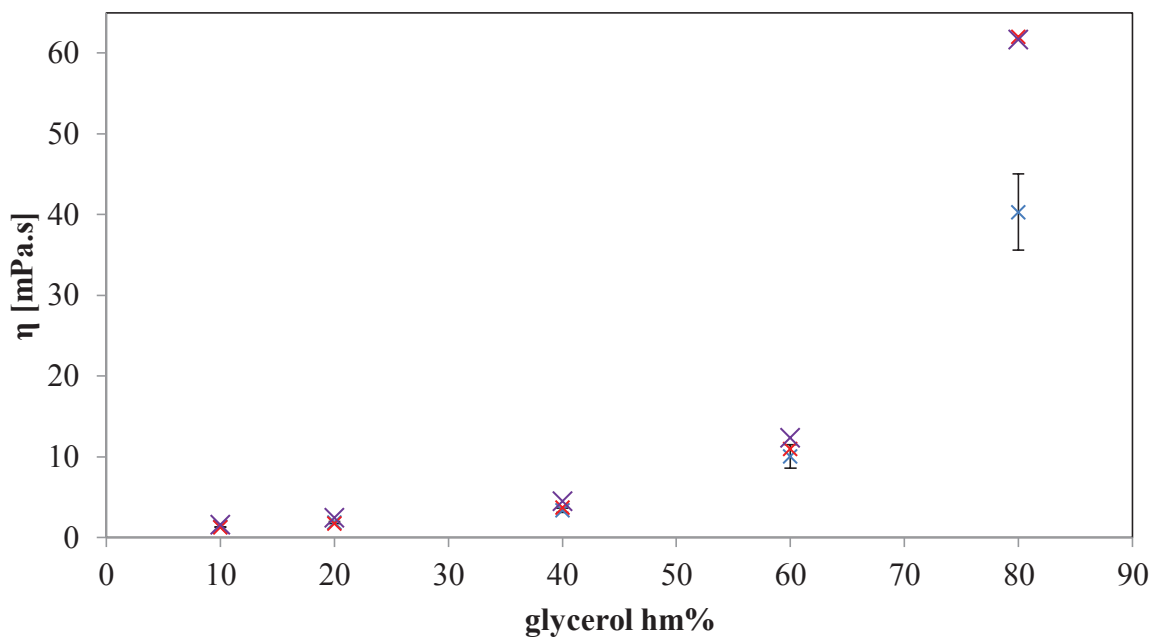
## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Glycerolová řada

Pro potvrzení správnosti mikreologické metody bylo měření provedeno s homogenní kapalinou – glycerolem a výsledky byly porovnány s tabelovanými hodnotami. Stanovení reologických vlastností mikreologickou metodou bylo provedeno celkem třikrát. Ze získaných hodnot pro každý vzorek byla vypočítána průměrná hodnota a byly určeny chybové úsečky. Měření klasickou reologií bylo z časových důvodů provedeno jednou. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

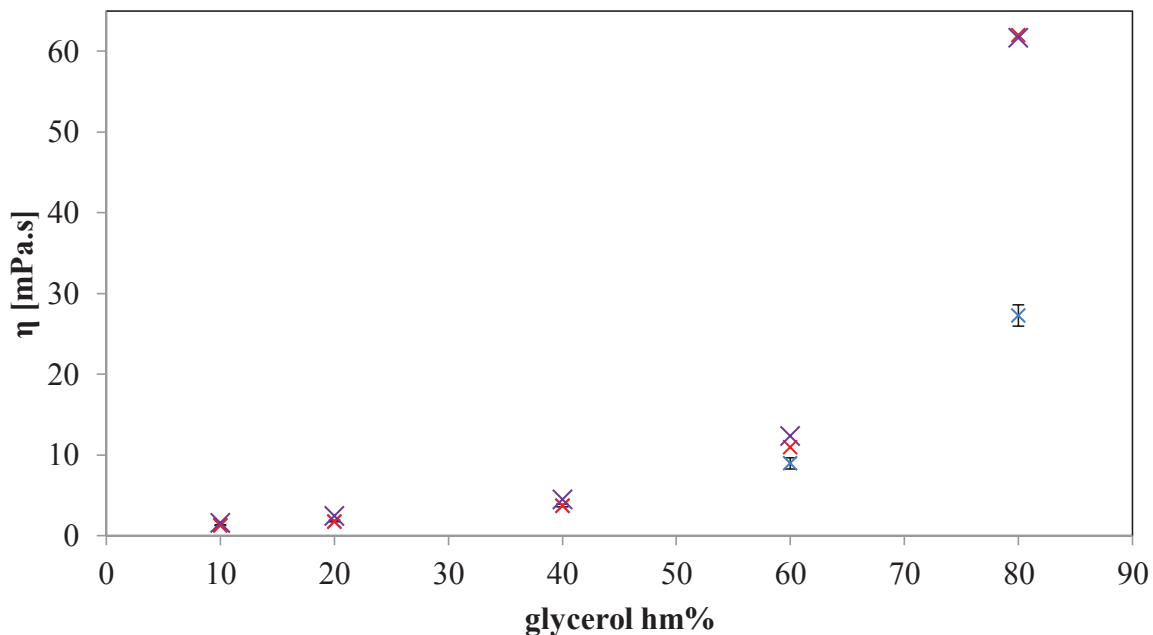


Obrázek 9: Graf znázorňující závislost viskozity na obsahu glycerolu ve vzorku, porovnání hodnot mikreologické metody, klasické reologie a tabelovaných hodnot (0,5  $\mu\text{m}$ )



× mikroreologické měření    × tabelované hodnoty    × reologické měření

Obrázek 10: Graf znázorňující závislost viskozity na obsahu glycerolu ve vzorku, porovnání hodnot mikroreologické metody, klasické reologie a tabelovaných hodnot (1 μm)



× mikroreologické měření    × tabelované hodnoty    × reologické měření

Obrázek 11: Graf znázorňující závislost viskozity na obsahu glycerolu ve vzorku, porovnání hodnot mikroreologické metody, klasické reologie a tabelovaných hodnot (2 μm)



Tabulka 1: Naměřené a tabelované hodnoty viskozit

Viskozita [mPa.s]	Hmotnostní procenta glycerolu ve vodě				
	10 %	20 %	40 %	60 %	80 %
Tabelované hodnoty	1,31	1,77	3,75	10,96	62,00
Klasická reologie	1,63	2,47	4,50	12,40	61,71
Mikroreologie:					
0,5 µm částice	1,26±0,06	1,89±0,12	3,35±0,08	9,65±0,55	37,48±0,24
1 µm částice	1,32±0,04	1,88±0,15	3,37±0,27	10,05±1,43	40,31±4,72
2 µm částice	1,31±0,01	1,83±0,11	3,74±0,16	8,98±0,68	27,28±1,30

Na obrázcích 9 až 11 jsou vyneseny hodnoty viskozit získané mikroreologickou metodou i metodou klasické reologie. Pro porovnání jsou v grafech uvedeny i tabelované hodnoty. Hodnoty viskozit měly vzestupnou tendenci s rostoucí koncentrací roztoků. Z tabulky 1 je patrné, že se u obou metod vykytují odchylky, které jsou relativně malé u nižších koncentrací, ale u 80% roztoku glycerolu jsou hodnoty získané mikroreologickou metodou značně nižší. Ani u opakovaných měření nebyla získána hodnota viskozity, která by byla bližší tabelované. Viskozita 80% roztoku glycerolu je nejspíš už příliš vysoká a vyskytuje se za hranicí měřitelnosti mikroreologické metody, protože nelze naměřit kvalitně vyhodnotitelné trajektorie částic.

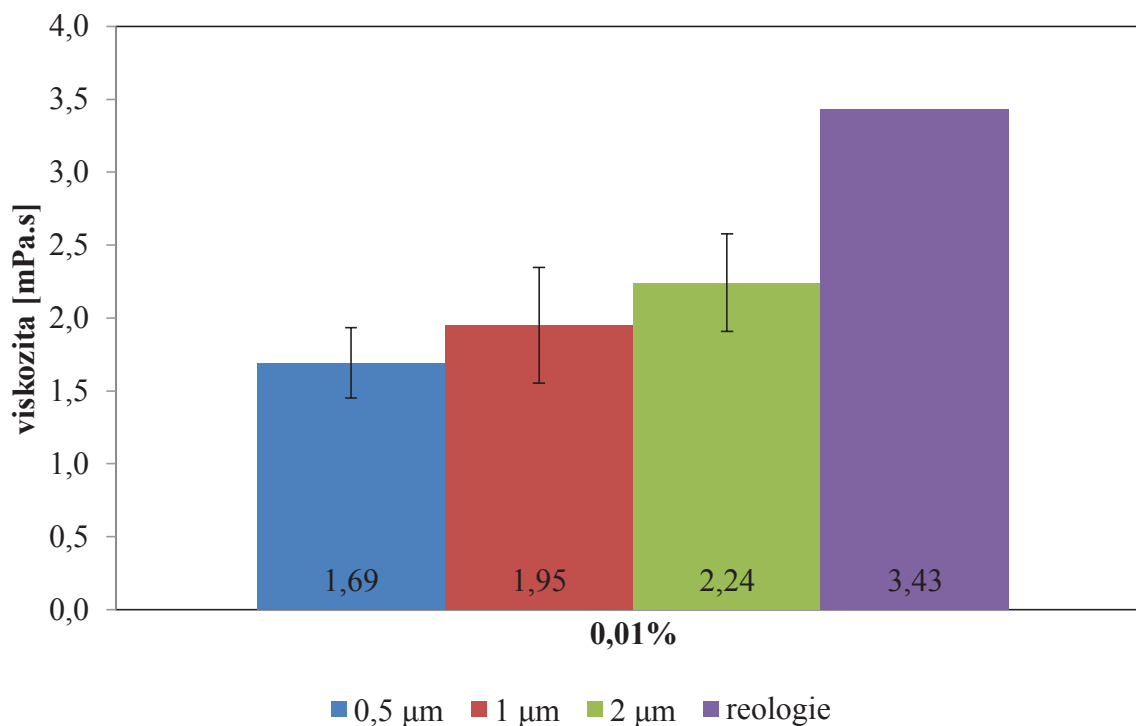
## 5.2 Řada hyaluronanu

Bylo provedeno měření koncentrační řady hyaluronanu o stejné molekulové hmotnosti pomocí mikrereologické a klasické reologické metody. Byly zvoleny hmotnostní koncentrace 0,01 %; 0,1 %; 0,5 % a 1 %. Pro celou řadu byly použity částice o stejném průměru jako v případě glycerolové řady. Měření bylo provedeno třikrát, ze získaných hodnot byly vyhodnoceny průměrné hodnoty a chybové úsečky.

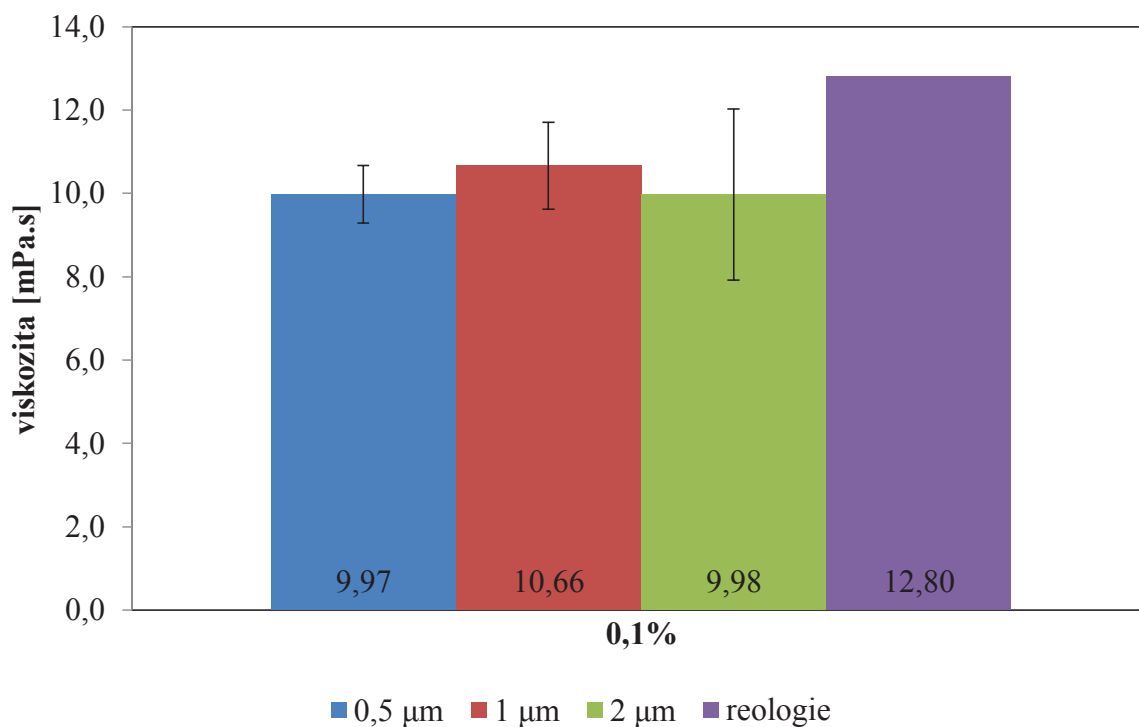
Pro každou hyaluronovou řadu bylo provedeno kontrolní měření se vzorky Mili-Q vody, aby bylo zjištěno, s jakou chybou měření probíhalo. Získané hodnoty difuzních koeficientů ze tří měření byly zprůměrovány, porovnány s tabelovanými hodnotami a na základě toho byla vypočítána odchylka. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2. Procentuální odchylky nejsou výrazně vysoké, a tak získané hodnoty nebyly dále přepočítávány.

Tabulka 2: Tabelované a naměřené hodnoty difuzních koeficientů pro Mili-Q vodu

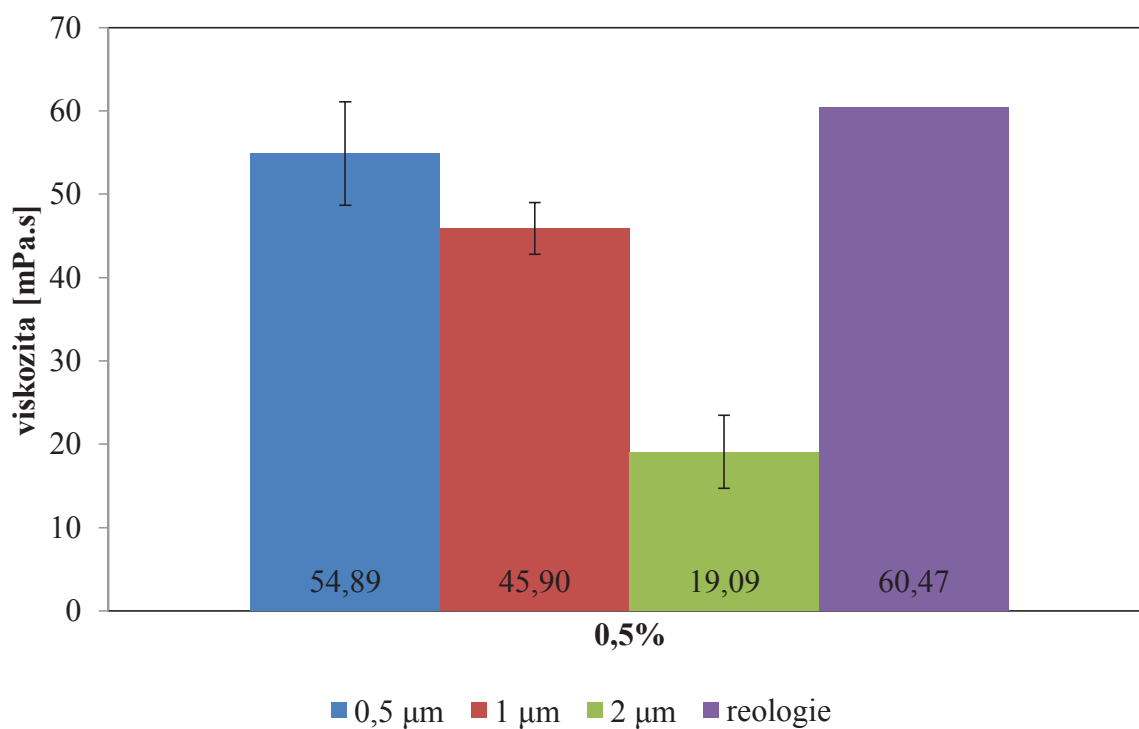
Difuzní koeficient [ $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ]	Mikrereologie		
	0,5 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$	2 $\mu\text{m}$
Tabelované hodnoty	0,881	0,440	0,220
Naměřené hodnoty	0,868	0,443	0,197
Odchylka	1,5 %	0,7 %	10,5 %



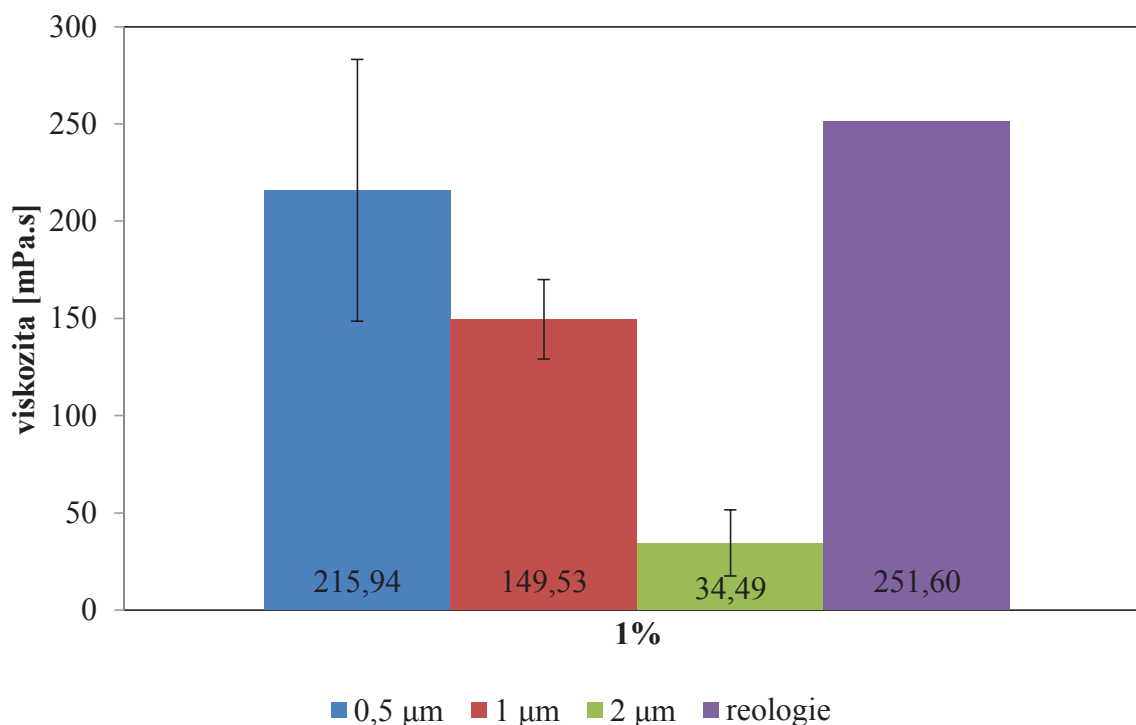
Obrázek 12: Porovnání hodnot viskozit 0,01 % roztoku hyaluronanu



Obrázek 13: Porovnání hodnot viskozit 0,1 % roztoku hyaluronanu



Obrázek 14: Porovnání hodnot viskozit 0,5 % roztoku hyaluronanu



Obrázek 15: Porovnání hodnot viskozit 1 % roztoku hyaluronanu

Na obrázcích 12 až 15 jsou uvedené grafy znázorňující hodnoty viskozit získaných mikroreologickou metodou a metodou klasické reologie. Při použití částic o různých velikostech u stejného vzorku dochází u některých koncentrací k výrazným odchylkám. Je tomu tak u vzorku s koncentrací 0,01 %, kdy se reologické hodnotě nejvíce blíží hodnota získaná s 2 µm částicemi. U vzorku o koncentraci 0,1 % jsou hodnoty viskozity pro všechny částice podobné, o něco blíž k reologické hodnotě má viskozita měřená s 1 µm částicemi. Pro vzorky s koncentracemi 0,5 % a 1 % platí, že mikroreologické hodnoty s 0,5 µm částicemi jsou nejbližší k reologickým hodnotám.

Tabulka 3: Hodnoty viskozity získané mikroreologickou a reologickou metodou

Viskozita [mPa.s]	Hmotnostní procenta hyaluronanu ve vodě			
	0,01 %	0,1 %	0,5 %	1 %
Klasická reologie	3,43	12,80	60,47	251,60
Mikroreologie:				
0,5 µm částice	1,69±0,24	9,97±0,69	54,89±6,22	215,94±67,40
1 µm částice	1,95±0,40	10,66±1,04	45,90±3,11	149,53±20,53
2 µm částice	2,24±0,34	9,98±2,05	19,09±4,39	34,49±16,91

V tabulce 3 jsou porovnány mikroreologické a reologické hodnoty viskozity pro koncentrační řadu hyaluronanu.

Obecně lze říct, že velikost požitých částic má vliv na výslednou viskozitu. Pro méně koncentrované roztoky polymerů jsou vhodnější větší částice, protože pokud je možné naměřit jejich kvalitní trajektorie, tak se mikroreologické výsledky více blíží těm reologickým. Je to pravděpodobně dáno tím, že větší částice víc převyšují rozměry volných prostorů polymerní sítě, kterou látka jakou hyaluronan tvoří, a proto jsou méně ovlivněny mikroskopickými heterogenitami takových roztoků. Naopak s rostoucí viskozitou se snižuje pohyblivost větších částic, proto se reologické a mikroreologické výsledky více shodují při použití menších částic. Také by se mohl uplatňovat vliv interakce částic s hyaluronanem, protože ten je záporně nabitý, což by odpovídalo tomu, že u větších koncentrací hyaluronanu jsou rozdíly v měřeních větší. To by bylo možné zjistit v dalších experimentech s pomocí dvoučásticové mikroreologie nebo použitím částic s upraveným povrchem.

## 6. ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo provést literární rešerši na zadané téma a zhodnotit vliv velikostí částic na mikreologické měření. Z literární rešerše vyplývá, že mikreologické studie byly porovnávány s jinými metodami, převážně s klasickou reologií, pokud to umožňovalo množství vzorku, aby byla dokázána správnost ještě stále nové mikreologické metody. Stejně tomu bylo i v mé práci, kde byly zvolené látky proměřeny metodou pasivní mikreologie i klasické reologie. Pro experimenty byl použit glycerol a jako biopolymer hyaluronan. Pro glycerol byly zvoleny hmotnostní koncentrace 10 %, 20 %, 40 %, 60 % a 80 %. Roztoky hyaluronanu měly hmotnostní koncentraci 0,01 %, 0,1 %, 0,5 % a 1 %. Částice pro mikreologické experimenty měly rozměr 0,5  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  a 2  $\mu\text{m}$ . Výsledky získané metodou pasivní mikreologie byly porovnány s výsledky klasické reologie, protože tato metoda už je dobře známá a prověřená. Hodnoty pro glycerol byly také srovnány s tabelovanými hodnotami, u hyaluronanu bylo provedeno kontrolní měření s vodou, aby byla zjištěna odchylka měření.

U výsledků experimentů s glycerolem bylo patrné, že hodnoty obou metod se od tabelovaných výrazně nelišily. Problém nastával u nejvyšší zvolené koncentrace, kdy u všech použitých částic byla hodnota viskozity výrazně nižší. Viskozita 80% glycerolu byla už velmi vysoká a nepodařilo se tedy naměřit kvalitně vyhodnotitelné trajektorie částic. U tohoto vzorku už byla pravděpodobně překročena hranice spolehlivé měřitelnosti pomocí jednočásticové mikreologie.

Mikreologické měření se vzorky Mili-Q vody bylo provedeno zároveň s proměřováním řad hyaluronanu, aby bylo zjištěno, s jakou chybou experimenty probíhaly, protože je nebylo možné porovnat s tabelovanými hodnotami jako v případě glycerolu. Získané hodnoty viskozit vody byly porovnány s tabelovanými a byla vypočítána procentuální odchylka. Pro měření s 0,5  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$  částicemi byla odchylka v podstatě zanedbatelná, u 2  $\mu\text{m}$  částic byla o něco větší, přesto nebylo nutné podle ní přepočítávat hodnoty viskozit hyaluronanu.

Při měření s hyaluronanem bylo zjištěno, že se nejlépe shodovaly mikreologické a reologické výsledky u nižších koncentrací s většími částicemi a u vyšších koncentrací s menšími částicemi. U 0,01% roztoku se nejvíce reologické hodnotě blížila viskozita získaná s 2  $\mu\text{m}$  částicemi. U 0,1% roztoku jsou hodnoty u všech částic podobné, ale u vyšších koncentrací se reologickým hodnotám nejvíce blíží hodnoty získané s 0,5  $\mu\text{m}$  částicemi.

Porovnáním hodnot získaných pomocí obou metod lze říct, že na mikreologické měření biopolymerního roztoku má vliv velikost použitých částic, záleží ovšem na oblasti viskozity zkoumaného roztoku. U nejnižší zvolené koncentrace se nejvíce blížily reologickým hodnotám výsledky s 2  $\mu\text{m}$  částicemi, u nejvyšší koncentrace s 0,5  $\mu\text{m}$  částicemi. U nižších koncentrací lze získat kvalitní trajektorie velkých částic, výsledná viskozita se pak nejvíce blíží hodnotě získané klasickou reologií. U vyšších koncentrací je tomu naopak, kvalitně vyhodnotitelné trajektorie lze získat u částic s menším rozměrem, proto jsou výsledky s těmito částicemi bližší těm reologickým. Je také možné, že u vysokých koncentrací dochází

k interakci částic s hyaluronanem, který je záporně nabitý, a proto jsou hodnoty viskozit tak nízké oproti reologickým. To by bylo možné zjistit dalšími experimenty s použitím částic s upraveným povrchem nebo pomocí metody dvoučásticové mikroreologie.

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] FRASER, J. R. E.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of internal medicine*, 1997, 242.1: 27-33.
- [2] BULPITT, Paul; AESCHLIMANN, Daniel. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, 47.2: 152-169.
- [3] Mechanika hornin, Reologie [online], [cit. 2014-01-20], dostupné z: <http://departments.fsv.cvut.cz/k135/data/wp-upload/2010/05/mechanika-hornin-6.pdf>
- [4] GARDEL, Margaret L.; VALENTINE, Megan T.; WEITZ, David A. Microrheology. In: *Microscale diagnostic techniques*. Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 1-49.
- [5] MANSEL, Bradley William. Setup and calibration of a suite of state-of-the-art microrheology techniques: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science in Physics at Massey University, Palmerston North, New Zealand. 2011. PhD Thesis.
- [6] Bartovská Lidmila, Šišková Marie: Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav [online]. Version 1.0. Praha: VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2014-02-10]. Dostupné z: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/>. ISBN 80-7080-579-X
- [7] WEIN, Ondřej. Úvod do reologie. Malé Centrum, Brno, 1996. Skripta. VUT, Brno.
- [8] Bartovská Lidmila, Šišková Marie: Co je co v povrchové a koloidní chemii [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2014-02-11]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/ebook.help.htm](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/ebook.help.htm)
- [9] MEISSNER, Bohumil a ZILVAR, Fyzika polymerů: Struktura a vlastnosti polymerních materiálů. Praha: SNTL, 1987. ISBN 8732198530.
- [10] Barnes, H. A.: An introduction to rheology, 1998.
- [11] MASON, T. G., et al. Particle tracking microrheology of complex fluids. *Physical Review Letters*, 1997, 79.17: 3282.
- [12] LEVINE, Alex J.; LUBENSKY, T. C. One-and two-particle microrheology. *Physical review letters*, 2000, 85.8: 1774.
- [13] DASGUPTA, Bivash R., et al. Microrheology of polyethylene oxide using diffusing wave spectroscopy and single scattering. *Physical Review E*, 2002, 65.5: 051505.



- [14] DE BRUYN, John R. Modeling the microrheology of inhomogeneous media. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 2013, 193: 21-27.
- [15] NIJENHUIS, Nadja, et al. Microrheology of hyaluronan solutions: implications for the endothelial glycocalyx. *Biomacromolecules*, 2008, 9.9: 2390-2398.
- [16] EHRENBERG, Morton; MCGRATH, James L. Binding between particles and proteins in extracts: implications for microrheology and toxicity. *Acta biomaterialia*, 2005, 1.3: 305-315.
- [17] MOSCHAKIS, Thomas; MURRAY, Brent S.; DICKINSON, Eric. On the kinetics of acid sodium caseinate gelation using particle tracking to probe the microrheology. *Journal of colloid and interface science*, 2010, 345.2: 278-285.
- [18] LEE, Hyungsuk, et al. Passive and active microrheology for cross-linked F-actin networks in vitro. *Acta biomaterialia*, 2010, 6.4: 1207-1218.
- [19] DANIELS, Brian R., et al. Differences in the microrheology of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Biophysical journal*, 2010, 99.11: 3563-3570.
- [20] SLOPEK, Ryan P., et al. In situ monitoring of mechanical properties during photopolymerization with particle tracking microrheology. *Polymer*, 2006, 47.7: 2263-2268.

## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

MSD	Mean squared displacement
PEO	Polyethylenoxid
QELS	Quasielastic light scattering
DWS	Diffusing wave spectroscopy
HA	Hyaluronan
EG	Endoteliální glykokalix
HIPS	Human induced pluripotent stem cells
HES	Human embryonic stem cells
DMPA	2,2-dimethoxy-1,2-difenylethan-1-on
$G^*$	Komplexní smykový modul
$G'$	Elastický modul
$G''$	Viskozitní modul
$\tau$	Tečné napětí
$\eta$	Dynamická viskozita / zdánlivá viskozita
$D$	Difuzní koeficient
$du$	vzájemná rychlost pohybu smykových rovin o $dx$
$\Delta x_i$	posuv částice
$\tau_2 - \tau_1$	časový interval
$k_B$	Boltzmanova konstanta
$T$	teplota
$a$	poloměr částice
$L$	délka posunu
$(\Delta x^2(t))$	MSD
$d$	dimenze